Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Bennhold

Beitrag zur hormonalen Steuerung des Mineralstoffwechsels

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Siegfried Heller
aus Stuttgart

7046

1961

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Bennhold

Beitrag zur hormonalen Steuerung des Mineralstoffwechsels

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Siegfried Heller
aus Stuttgart

Dekan: Professor Dr. E. Tonutti

1. Berichterstatter: Wiss.-Rat Dozent Dr.-Ing. G. Hillmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Bennhold

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Für die wissenschaftlichen Anregungen und die Überlassung des interessanten Themas möchte ich meinem verehrten Lehrer Wissenschaftlicher Rat Dozent Dr.-Ing. G. Hillmann herzlich danken. Ferner schulde ich dem Direktor der Medizinischen Universitäts-Klinik Herrn Professor Dr. H. Bennhold für die Möglichkeit der Benutzung der Laboratoriumsräume und -Einrichtungen aufrichtigen Dank.

Inhalt

A. Untersuchungen über den Einfluß von Insulin auf die renale Exkretion

Einleitung 1
Methode 3
Ergebnisse 7
Diskussion 22
Zusammenfassung 24
Literatur 25

B. Untersuchung der renalen Phosphatexkretion beim Menschen mit trägerfreiem ^{32}P

Einleitung 29
Methode 30
Ergebnisse 31
Diskussion 38
Zusammenfassung 39
Literatur 40

A. Untersuchungen über den Einfluß von Insulin auf die renale Exkretion

Das Insulin wurde vor über einem halben Jahrhundert von Zülzer erstmalig dargestellt. Erst 1921 gelang es Banting und Best es in gereinigtem und 1925 Abel in kristallinem Zustand darzustellen. Das Hormon wird in den Langhans'schen Inselzellen des Pankreas gebildet und wirkt auf humoralem Wege auf das Stoffwechselgeschehen ein. Es wird wegen seiner Blutzucker senkenden Wirkung seit Jahrzehnten als Therapeutikum bei Diabetes mellitus verwendet. Die Beeinflussbarkeit des Kohlenhydratstoffwechsels durch Insulin bezieht sich vor allem auf Leber, Muskulatur und Fettgewebe, während an anderen Organen wie zum Beispiel Gehirn nach den bisherigen Untersuchungen keine Stoffwechseleffekte festgestellt werden konnten. Bei Untersuchungen über den Einbau von ^{14}C-Glukose unter Insulin in Leber- und Muskelglykogen stellte v. Holt (11) fest, daß dieselbe maximale Blutzucker senkende Wirkung, sowohl durch subcutane und intravenöse Insulininjektion, als auch durch Injektion in den Pfortaderkreislauf, erreicht wird. Dagegen wiesen die Radioaktivitätsmessungen Unterschiede auf. Bei der portalen Injektion, die den physiologischen Bedingungen entspricht, wurde vermehrt ^{14}C-Glukose in das Leberglykogen eingebaut, während bei subcutaner und intravenöser Injektion die Insulinwirkung in die Peripherie verlagert wurde und vermehrt ^{14}C-Glukose in das Muskelglykogen eingebaut wurde. Diese unphysiologische Form der Insulinapplikation, wie sie auch bei der Behandlung des Diabetes mellitus Anwendung findet, wurde von v.Holt (11) als invitro Bedingung bezeichnet. Durch den Anstieg der Insulinkonzentration im peripheren Kreislauf, wie dies nach der Insulininjektion bei der Diabetesbehandlung der Fall ist, gelangen unphysiologische Dosen an Insulin an die Niere. In den letzten Jahren wurden pathologische Veränderungen an den Nierengefäßen und am Tubulusepithel bei Diabetikern, die über Jahre mit Insulin behandelt wurden, beobachtet. (Buschmann (14), Stalder (21). Die Hälfte der Todesfälle bei Diabetikern sollen auf einer Nephropathie beruhen (Joslin und Wilson (12). Mit weiterer Verbesserung der Komabehandlung und antiinfektiösen Therapie, dürfte die Niereninsuffizienz in Zukunft als Todesursache überwiegen Stalder (21). Bisher

ist nur in wenigen Arbeiten die Beeinflussung der renalen Exkretion unter Insulingaben untersucht worden. In der Tubuluszelle der Niere soll eine bestimmte Insulinkonzentration bestehen, die durch Insulininjektionen beeinflußbar ist (Narahara (17). Das Insulin soll im Glomerulus filtriert und im Tubulus rückresorbiert werden. Hier soll es durch Peptidasen inaktiviert werden. Vogel (24) und Butturini (5) konnten einen Einfluß auf die Harnsekretion und auf die Harnzusammensetzung nachweisen. Beide Autoren fanden eine verminderte Diurese. Für die Urinreduktion an der Froschniere machte Vogel (24) eine verminderte Durchblutung und eine hierdurch verminderte Druckdiurese verantwortlich. Butturini (5) führte dagegen die Oligurie auf eine vermehrte tubuläre Wasserrückresorption zurück. Er konnte keine wesentliche Veränderung der Durchblutungsmenge und in der Zusammensetzung des Glomerulusfiltrats finden. Bei seinen Patienten stellte er eine Hypophosphatämie fest, die durch eine Insulin bedingte intrazelluläre Verschiebung der PO_4^{---} Ionen hervorgerufen werden soll. In den tiefsten geraden Teilen der Hauptstücke der Harnkanälchen fand man in Diabetikernieren eine Glykogenspeicherung (Armanni-Ebstein-Zellen), die verschiedentlich als mehr oder weniger spezifisch für die Zuckerkrankheit erachtet wurde (Kimmelstiel (15). Beim erwachsenen Diabetiker ohne Nephropathie wurde schon vor 25 Jahren von Cambier (6) eine erhöhte Filtrationsmenge mit Hilfe der Kreatinin-Clearance gefunden und später von Spühler (20), Kleinschmidt (16), Greif (9), Robertson und Gray (19) mittels der Inulin-Clearance bestätigt. Lediglich Spühler (20) hat diesen Befund interpretiert. Er führte ihn auf eine gesteigerte Kapillarpermeabilität beim Diabetes mellitus zurück. Ohne die entsprechende Anpassung der Niere würde die hohe Filtratmenge zu immensen Wasser- und Elektrolytverlusten führen, Ein solcher Effekt soll vom Organismus durch eine kompensatorisch-funktionelle Hypertrophie des proximalen Tubulusepithels ausgeschaltet werden. Die funktionell bedingte Nierenhypertrophie kommt pathologisch-anatomisch in einem erhöhten Nierengewicht zum Ausdruck (Stalder (21). Goth (7) fand bei Ratten eine Nierenläsion nach Insulin- und Glukoseinjektionen, die histolo-

gisch eine Ähnlichkeit mit den Veränderungen bei diabetischer Nephropathie aufwies.

Es ist ferner bekannt, daß eine Hyperkaliämie kurzfristig durch Gaben von Insulin zusammen mit Glukose beseitigt werden kann (Bland (2). Bei der Behandlung des Koma Diabetikums wurde eine erhebliche Kaliumverarmung des Körpers mit abnorm niedrigen Blutwerten festgestellt. Von Grafe und Kühnau (8) wurde angenommen, daß diese Befunde durch die reichliche Flüssigkeitszufuhr und durch die energische Insulintherapie bewirkt wurden. Auf Grund der zitierten Arbeiten ergab sich die Frage, ob die angeführten Effekte auf einen direkten oder indirekten Angriff des Insulins auf die renale Funktion zurückzuführen waren. Als Beitrag zu dieser Fragestellung wurde die renale Exkretion von Phosphat, Jodid, Chlorid und einiger harnpflichtiger Substanzen nach parenteraler Insulinapplikation untersucht. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich an Ratten angestellt und die Ergebnisse an anderen Tierspecies und nierenkranken Patienten reproduziert.

M e t h o d e

Zur Gewinnung des Tagesurins wurden die Tiere in Stoffwechselkäfigen aus Plastik gehalten. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Albinoratten (120-150 gr. Lebendgewicht) verwandt, um geschlechtsgebundene Schwankungen auszuschließen. Jeweils zwei Tiere wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in paraffinierte, trichterförmige Stoffwechselkäfige gesetzt, Sie bekamen über diese Zeit keine feste oder flüssige Nahrung zugeführt. Bei Versuchsbeginn wurde den Tieren 5 ml 0,9%ige Kochsalzlösung und in einigen Versuchsreihen 30 μC ^{32}P intraperitoneal injiziert. Jede Versuchsreihe bestand aus vier Kontroll- und zwei mal vier "Insulintieren". Es wurden entweder 0,1E und 0,5E glukagonfreies Kristallinsulin Novo oder Altinsulin[+)] Hoechst subcutan injiziert.

+) Da unter glukagonfreiem Kristallinsulin Novo in der Ausscheidung kein Unterschied gegenüber Altinsulin Hoechst festzustellen war, wurden die weiteren Versuche mit Altinsulin Hoechst angestellt.

Die Versuchsdauer betrug 48 Stunden, wobei der Tagesurin von jeweils zwei Tieren getrennt untersucht wurde. Hierbei traten individuelle Schwankungen deutlich in Erscheinung.

Für die Untersuchung der renalen Jodidexkretion wurden nur männliche Albinoratten (120-130 gr. Lebendgewicht) in Stoffwechselkäfigen gehalten. Es wurden je Ratte 70 γ $C^{131}J^-$ und 0,5E Altinsulin Hoechst, den Kontrolltieren dieselbe Flüssigkeitsmenge an Ringerlösung subcutan injiziert. Der Urin wurde nach 6 und 24 Stunden untersucht. Nach 24 Stunden wurden die Tiere in Chloroformnarkose entblutet und die Thyreoidea entfernt.

Die weiblichen Meerschweinchen (300-400 gr. Lebendgewicht) wurden jeweils in Vierergruppen, ohne Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr, in Stoffwechselkäfigen gehalten. Jedem Tier wurden 0,2E Altinsulin Hoechst, den Kontrollen die gleiche Flüssigkeitsmenge in Form von Ringerlösung subcutan injiziert.

Bei den Stoffwechseluntersuchungen der fastenden Kaninchen (3 - 3,5 kg Lebendgewicht) diente der erste Tag im Stoffwechselkäfig zur Kontrolle und am zweiten Tag wurde den Tieren 0,1E Altinsulin Hoechst und Ringerlösung subcutan injiziert.

Für die Untersuchungen der renalen Jodidexkretion wurden den Kaninchen je 30 γ $C^{131}J^-$, 0,3E Altinsulin Hoechst (den Kontrolltieren dieselbe Flüssigkeitsmenge in Form von Ringerlösung) subcutan injiziert. Zur Gewinnung eines fraktionierten Urins wurde den Versuchstieren für die Dauer von 6,5 Stunden ein Urethrakatheter gelegt. Der Urin wurde in Abständen von 30 Minuten abgelassen und portionsweise untersucht. Für die restlichen 17,5 Stunden wurden die Tiere in Stoffwechselkäfigen gehalten. Von weiteren Tieren wurde nur die Tagesurinmenge gesammelt. Der stark alkalische Harn wurde mit einigen Tropfen 4n-Schwefelsäure angesäuert.

Die im Urin befindlichen schwerlöslichen Ca- und Mg-Phosphatsalze wurden durch Ansäuern mit einigen Tropfen konzentrierter HCL in Lösung gebracht. Zur Bestimmung des freien Phosphates wurde die Methode nach Weil-Malherbe und

und Green (25) gewählt, die sich zu Mikromessungen sehr gut eignet, und die Extinktion mit dem Eppendorf Photometer gemessen. Die Extinktion wurde auf P bezogen. Das säurelabile Phosphat wurde durch 10 Min.Hydrolyse mit 2n HCl 1:1 hydrolysiert und nach der oben beschriebenen Methode bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtphosphatmenge wurde zuerst die Veraschungsmethode nach King (14) mit Perchlorsäure verwandt, die jedoch eine Reihe von Fehlerquellen hat und für die folgenden Untersuchungen nicht geeignet war. Nach King (14) soll die zu messende Substanz so bemessen sein, daß der Verbrennungsrückstand vollständig photometrisch erfaßt werden kann. Es soll die Probe nicht mehr als 5-10γ P enthalten. Dies läßt sich bei Urinuntersuchungen mit so großen Einzelschwankungen schlecht oder nur mit mehreren Probemessungen einhalten. Ebenfalls läßt sich die Einengung des Säurevolumens bei kleinen Urinmengen nicht völlig vermeiden, wodurch ein Verlust an Phosphorsäure und die Bildung von Metaphosphorsäure bewirkt wird. Diese Effekte können schon durch geringe Temperaturschwankungen eintreten. Zur Erfassung der Metaphosphorsäure muß noch für kurze Zeit mit H_2O hydrolysiert werden. Um diese Fehlerquellen ausschließen zu können, wurde ein geeignetes Verfahren gesucht, das in der Hydrolyse mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure (Dichte-1,48) gefunden wurde. Zur Prüfung der Methode wurden Hydrolysekurven von zwei schwer hydrolysierbaren Phosphatverbindungen aufgenommen.

Am Rückflußkühler wurde bei kleiner Flamme eine 40mg%ige Ca-salzlösung der 1-Phosphorglyzerinsäure und eine 40mg%ige Ca-salzlösung der Fruktose-1,6-diphosphats (Boehringer) über 3 Stunden mit der 5fachen Menge konzentrierter Bromwasserstoffsäure gekocht. Durch die Kühlung entfällt die Gefahr des Verdampfens der Phosphorsäure, sowie die Notwendigkeit der Hydrolyse der Metaphosphorsäure mit H_2O, da infolge des niederen Siedepunkts der Bromwasserstoffsäure keine Metaphosphorsäure entsteht. Das Phosphat wurde nach Weil-Malherbe und Green bestimmt. Aus dem Verlauf der Hydrolysenkurve nach 3 Stunden ergibt sich eine vollständige Hydrolyse.

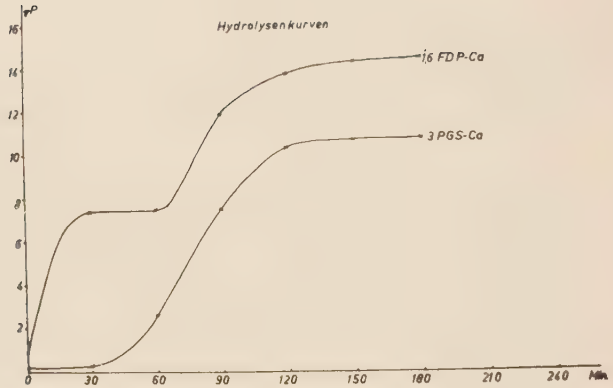


Abb.1: Hydrolysenkurven der Ca-Salze der Fruktose-1,6-diphosphats und der 3-Phosphorglyzerinsäure

Während bei der bisherigen Veraschungsmethode mit Perchlorsäure keine exakt reproduzierbare Werte erhalten werden konnten, war dies bei der Veraschung mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure möglich.

Die Thyreoiden wurden mit je 2 ml Ameisensäure homogenisiert. Zur Chromatographie wurde die Ameisensäurelösung im Vakuum bis zur Trockenen eingeengt. Der Rückstand wurde in einem Phosphatpuffer pH 8,4 und einem Zusatz von 4.10^{-3} mol. $MnSO_4$ und 1% Pankreatin Merk aufgenommen und nach Überschichtung mit Toluol im Brutschrank bei 37°C 24 Stunden verdaut (22). Von dieser Lösung wurden 0,1 ml auf einem 4 cm breiten Chromatographierpapierstreifen (Schleicher und Schüll Nr.2316) aufgetragen. Es wurde absteigend über 24

Stunden bei Zimmertemperatur in einem System von n-Butanol, Dioxan und 0,6n-Ammoniumhydroxyd (4:1:5) entwickelt (14). Die Anfertigung der Radioautogramme erfolgte auf Adox Röntgenfilmen.

Die Bestimmung der Elektrolyte erfolgte mit dem Eppendorff-Flammenphotometer, die von Chlorid nach K.Lang, Harnstoff nach Kowarski, Kreatinin nach Folin, Magnesium nach Orange und H.C.Rhein.

Die Radioaktivitätsmessung erfolgte mit einem FH49 der Firma Frieseke & Hoepfner und einem Geiger-Müller Halogenzählrohr. Die spezifische Radioaktivität pro γ P, wurde durch Division der im Butanolextrakt gemessenen Impulse durch die entsprechende Phosphatmenge in γ P erhalten (Imp/γP). Die Radioaktivitätsmessung im Serum wurde im Bohrlochkristall und dem Zählgerät FH 49 ausgeführt. Bei nierenkranken Patienten wurde der 24 Stundensammelurin nach ein oder mehrmaliger Insulininjektion untersucht.
Patient B.R. 54J. m. mit Verschluß der A.retinae links und Hypertonie, die auf einen renalen Hochdruck zurückgeführt wurde. Der Phenolrottest betrug 22%.
Patient M.J. 39 J. m. wurde wegen eines Diabetes insipidus stationär behandelt. Bei Durstversuchen wurde ein mangelhaftes Konzentrationsvermögen der Niere festgestellt. Phenolrottest 17.5%.
Patient S.O. 47J. m. Nephrolithiasis bei Hypercalcämie nach jahrelanger AT_{10} Überdosierung nach Strumektomie. Hierdurch entstand eine tubuläre Schädigung der Niere. Phenolrottest 3,4%.

E r g e b n i s s e

Um die Rattenniere in ihrer Funktion zu beeinflussen, mußten bezogen auf das Körpergewicht, hohe Insulindosen gewählt werden. Die Tiere sprachen während der einzelnen Versuchsreihen unterschiedlich an. Während unter 0,1E Insulin die Diurese nicht beeinflußt wurde, war mit 0,2E ein deutlicher Effekt zu verzeichnen. Die Art der Applikation und das Geschlecht hatten keinen Einfluß auf die Insulinwirkung.

Es wurden folgende Stoffwechseleffekte gefunden:

1. Das Insulin wirkte als Diuretikum. Dies war besonders in den ersten zwei Stunden nach Versuchsbeginn zu beobachten, während in der Tagesurinmenge die Auswirkung nicht mehr prägnant zur Geltung kam. Am zweiten Versuchstag war das Insulin inaktiviert und die ausgeschiedene Harnmenge ging wieder auf den Ausgangswert zurück. Die erhöhte Diurese ist nicht durch eine verminderte Wasserrückresorption bedingt. Gleichzeitig erfolgte ein Anstieg der Phosphat-, Kalium- und Kreatinausscheidung. Diese Werte werden als Mittelwerte angegeben.

2. Parallel zu den steigenden Insulinkonzentrationen war die Phosphatausscheidung erhöht. Der Urin der Kontrolltiere wies zum Teil große Schwankungen auf, die durch 24stündiges Fasten vor Versuchsbeginn nicht ausgeschlossen werden konnten. Es wurde Gesamtphosphat bestimmt. Nach der Injektion von 0,1E Insulin stieg die Gesamtphosphatausscheidung um 9%, während sie bei 0,5E im Durchschnitt 106% betrug. Bereits am zweiten Tag war diese Funktionssteigerung wieder weitgehend normalisiert.

3. Mit dem Anstieg der Diurese sank die Gesamtradioaktivität in 1 ml Urin. Dasselbe galt für die spezifische Radioaktivität (Imp/γP).

4. Es wurde ein Effekt in der Ausscheidung der Kationen gefunden. Während die Natriumausscheidung weitgehend unbeeinflußt blieb, wurde Kalium unter Insulingaben durch die Niere vermehrt ausgeschieden. Am ersten Tag betrug die Erhöhung der Kontrollwerte 31%, bei 0,5E 208%; am zweiten bei 0,1E 25% und bei 0,5E 32%.

5. Ferner wurde Kreatinin vermehrt im Urin ausgeschieden. Auf die Insulininjektion von 0,1E stieg die Ausscheidung um 20% und auf 0,5E um 63%, am zweiten Tag unter 0,1E um 63% und unter 0,5E um 16% an.

Tabelle 1. Renale Exkretion bei Ratten unter 0,1 E; 0,2 E; 0,5 E Insulin

		Datum	K mval	Na mval	Ca mval	mg Kreatinin	mg Gesamtphos.	Imp/j P spez. R. Akt	Imp/ml Gesamt-R. Akt	ml Urin
Kontrolle	1. Tag	21. V.	4,25	17,6	0,226	8,78	17,1	—	—	4,2
		s. c.	2,5	12,5	0,127	5,37	6,75	—	—	3,5
		29. V.	3,28	2,86	0,067	3,77	4,68	89	51390	1,5
		s. c.	5,28	6,92	0,141	5,01	12,3	49	43310	2,5
		30. VI.	12,4	11,0	0,204	2,08	17,8	86	36706	5,6
		s. c.	11,6	8,0	0,187	1,77	18,0	38	39810	4,9
		14. VII. i. v.	2,92	4,93	0,049	6,9	8,5	31	71845	1,1
		20. X.	8,0	20,3	0,328	11,6	13,5	19	22956	4,0
		s. c.	9,65	15,6	0,27	8,5	14,4	16	16152	6.5
	2. Tag	21. V.	5,76	10,6	0,145	7,2	10,3	—	—	2,8
		s. c.	7,06	13,6	0,172	9,47	14,2	—	—	3,7
		29. V.	8,8	18,6	0,315	2,87	29,6	20	23632	8,8
		s. c.	9,0	18,05	0,495	4,39	32,8	22	35600	9,0
		30. VI.	3,48	7,95	0,088	0,91	13,9	17	46520	2,8
		s. c.	4,74	9,14	0,094	1,03	19,8	16	58448	3,0
		14. VII. i. v.	5,6	6,36	0,80	5,16	8,75	20	36610	1,2
		20. X.	5,9	5,16	0,121	4,07	10,02	10	17404	2,2
		s. c.	8,22	7,5	0,216	5,71	12,0	10	14546	1,9
0,1 E Insulin	1. Tag	21. V.	10,0	6,53	0,231	10,05	12,8	—	—	3,6
		s. c.	12,5	7,6	0,169	8,0	11,5	—	—	4,0
		29. V.	3,94	3,6	0,104	3,52	8,74	32	54248	1,2
		s. c.	4,48	5,05	0,128	5,01	10,86	36	65460	2,5
		30. VI.	9,23	5.14	0,133	1,3	17,1	62	31650	4,0
		s. c.	16,0	11,1	0,35	2,48	15,45	56	43608	7,6
		14. VII.	6,74	12,6	0,128	11,72	12,85	54	53604	3,9
		i. v.	7,0	17,8	0.134	15,7	20,6	17	35292	6,5

		Datum	K mval	Na mval	Ca mval	mg Kreatinin	mg Gesamtphos.	Imp/j P spez. R. Akt	Imp/ml Gesamt-R. Akt	ml Urin
0,1 E Insulin	2. Tag	21. V.	7,17	8,1	0,16	8,1	12,15	—	—	3,5
		s. c.	6,8	6,8	0,206	5,56	9,1	—	—	2,6
		29. V.	17,2	19,7	0,482	17,8	34,0	25	21352	7,8
		s. c.	12,2	13,0	0,25	15,8	27,8	20	38832	6,8
		30. VI.	6,35	11,4	0,128	1,15	24,2	32	20104	4,0
		s. c.	3,83	9,2	0,1	0,94	20,4	21	53076	4,7
		14. VII.	7,7	6,2	0,118	1,98	19,38	14	34776	2,5
		i. v.	3,82	6,5	0,082	8,16	9,41	15	21570	2,4
0,2 E	1. Tag	20. X.	11,3	28,5	0,446	13,2	33,7	17	14842	8,0
		s. c.	10,46	19,7	0,444	19,8	26,6	14	10150	12,0
	2. Tag	20. X.	10,15	3,45	0,145	5,33	14,0	9	19376	2,5
		s. c,	9,23	5,65	0,136	5,0	14,8	12	15498	1,4
0,5 E Insulin	1. Tag	21. V.	5,22	19,9	0,235	11,7	21,3	—	—	7,4
		s. c.	5,66	19,8	0,318	12,05	20,58	—	—	4,8
		29. V.	9,45	22,5	0,43	9,16	28,9	31	22025	12,3
		s. c.	25,4	44,0	0,525	16,88	34,2	35	28222	12,1
		30. VI.	54,3	17,4	0,775	5,03	36,0	35	35810	18,0
		s. c.	49,2	22,3	0,65	3,55	31,3	32	24400	19,0
		14. VII.	7,69	13,8	0,151	11,6	17,6	64	59084	3,9
		i. v.	6,9	20,2	0,103	8,26	17,5	33	46350	5,4
	2. Tag	21. V.	9,21	13,3	0,169	9,36	13,4	—	—	5,1
		s. c.	13,25	15,1	0,285	9,01	12,6	—	—	2,4
		29. V.	10,3	8,7	0,3	14,7	26,4	37	37572	5,3
		s. c.	13,3	12,2	0,274	2,94	29,0	28	42244	9,0
		30. VI.	1,66	4,1	0,573	0,88	19,1	17	20004	2,6
		s. c.	1,86	6,35	0,646	1,04	22,7	16	33968	4,0
		14. VII.	7,32	7,45	0,115	1,86	17,6	17	32608	2,0
		i. v.	9,2	8,6	0,172	2,3	24,18	15	30080	2,6

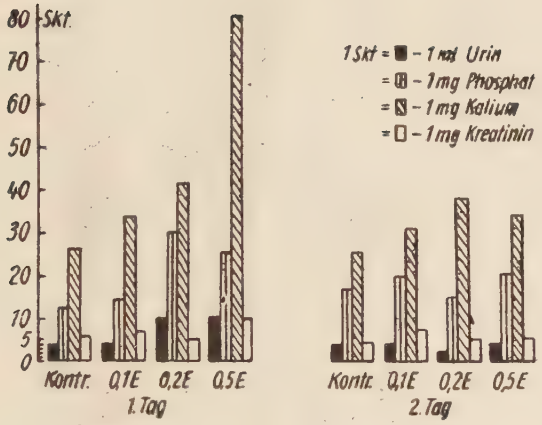


Abb.2: Mittelwerte der renalen Exkretion bei gehungerten Ratten unter Insulin

6. In den ersten 6 Stunden war die $^{131}J^-$Ausscheidung um 100% erhöht. Dagegen war die $^{131}J^-$Exkretion, bezogen auf die Tagesurinmenge, nur um 52% erhöht.
7. Die $^{131}J^-$Speicherung in der Thyreoidea wurde durch Insulin nicht beeinflußt. Radiochromatographisch konnte kein Unterschied in der Verteilung der $^{131}J^-$ markierten Jodaminosäuren gefunden werden.
8. Die Gesamtradioaktivität des Serums, das ^{131}PBJ, sowie die Konversionsrate waren bei den Insulintieren geringfügig, jedoch nicht signifikant erhöht.

	Urin		Thyreoidea	Serum		
	^{131}J (%) 6 Std	^{131}J (%) 24 Std	^{131}J-Speicherung (%)	Serumgesamtaktivität (%)	^{131}PBJ (%)	Konversionsrate (%)
Insulin	21,2	23,4	11,9	4,74	2,62	55,3
	15,4	16,5	15,2	1,0	0,73	73,0
	30,0	30,2	13,1	1,7	1,39	82,0
	10,7	13,6	20,5	0,66	0,46	69,8
	10,4	11,1	14,9	1,18	1,05	89,0
	7,6	8,1	13,7	2,0	1,74	87,0
Kontrolle	5,35	6,4	21,2	2,12	1,86	87,8
	14,4	16,25	8,42	0,86	0,35	41,5
	14,75	20,4	12,9	1,11	0,74	66,2
	5,6	10,3	10,4	1,58	0,68	43,0
	6,04	10,3	12,3	1,58	1,02	64,5
	2,66	3,32	16,9	1,29	0,97	28,6

Tabelle 2: Renale ^{131}J-Exkretion und ^{131}J-Verteilung im Organismus bei Ratten

Auf die Injektion von 0,2E Altinsulin Hoechst stieg bei den Meerschweinchen die Diurese um 96% an. Auch von diesen Tieren wurde ein höhergestellter Urin ausgeschieden. Die Gesamtphosphatausscheidung war um 70% erhöht. Unter den Kationen war am auffälligsten der Anstieg der Kaliumexkretion, der um 35% höher war, als bei den Kontrolltieren. Gleichzeitig wurde 67% vermehrt Kreatinin im Urin ausgeschieden.

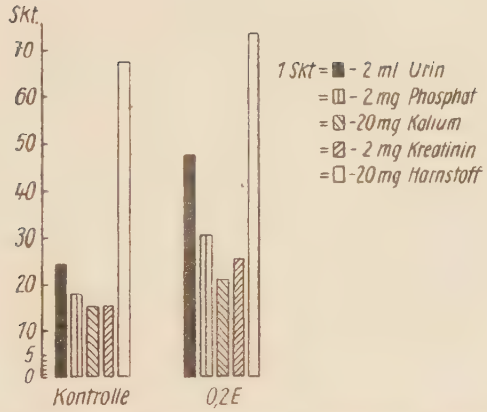


Abb. 3. Mittelwerte der renalen Exkretion bei hungernden Meerschweinchen unter Insulin

	ml Urin	mg Gesamt-phos-phat	K mval	Na mval	Ca mval	Cl mval	Mg mval	mg Krea-tinin	mg Harn-stoff
Kontr.	48	35,3	78,5	95,8	18,8	37,8	5,64	30,0	1340
0,2 E	94	60,0	106,0	102,0	21,7	66,3	10,5	50,3	1450

Tabelle 3 Renale Exkretion bei Meerschweinchen unter 0,2 E Altinsulin

Da das Kaninchen auf besonders kleine Insulindosen, bezogen auf das Körpergewicht, anspricht und an diesem Tier die Insulineinheit definiert worden ist, wurde der Einfluß des Insulins auch auf die renale Exkretion beim Kaninchen geprüft. Der erste Versuchstag im Stoffwechselkäfig wurde bei den Kaninchen als Kontrolle verwendet. Am zweiten Tag wurde ihnen 0,1E Altinsulin Hoechst subcutan injiziert. Die Diurese nahm bei allen Tieren in starkem Maße zu, ebenfalls die ausgeschiedene Gesamtphosphatmenge. Die Urinmenge betrug das 2,5fache des Vortags. Unter der erhöhten Diurese wurden vermehrt Anionen ausgeschieden.

1. Die Phosphatexkretion stieg um 160% an.
2. Die Chloridausscheidung war um 100% erhöht.

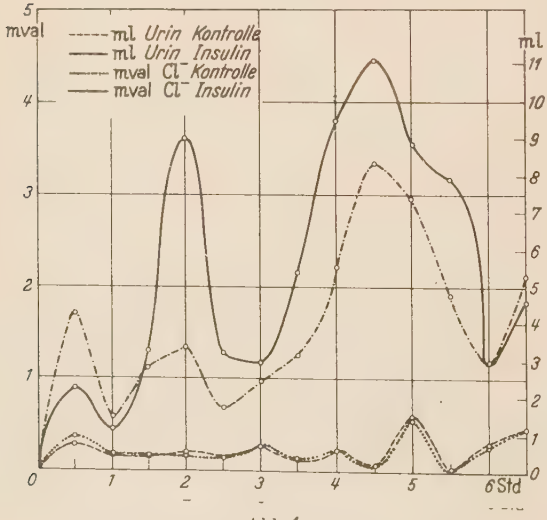


Abb. 4

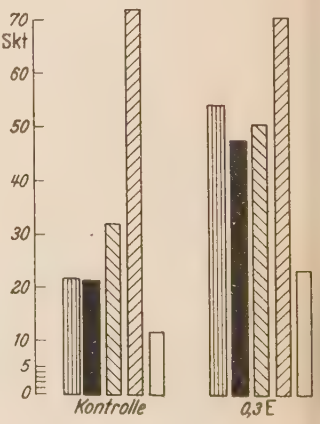


Abb. 5

Abb. 4 Diurese und Cl-Exkretion nach Insulininjektion (Kaninchen II und III)

Abb. 5 Mittelwerte der renalen Exkretion unter Insulin beim Kaninchen innerhalb 24 Std (6 Kontroll- und 6 Insulintiere). 1 Skt. = ▥ 3 ml Urin; ■ 1 % ^{131}J; ▨ 3 mval Na; ▧ 3 mval K; □ 3 mval Cl

3. Von den Kaninchen, die mit $^{131}J^-$ gespritzt wurden, schieden die Insulintiere das 2,3 fache an $^{131}J^-$ aus gegenüber den Kontrolltieren. Die fraktionierten Urinuntersuchungen zeigten, daß Insulin innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Injektion die Jodidausscheidung erhöhte. Danach näherte sich die renale $^{131}J^-$ Exkretion den Werten der Kontrolltiere.
Die $^{131}J^-$ Exkretion wurde auch unter Glukagon untersucht, da alle handelsüblichen Insulinpräparate kleine Mengen an Glukagon enthalten. Mit kristallisiertem Glukagon (Novo) ergab sich, daß die $^{131}J^-$ Exkretion im Urin (20 γ Glukagon, subcutan injiziert) innerhalb der Kontrollwerte lag.

4. An Kationen wurden 55% vermehrt Natrium im Urin ausgeschieden. Die Unterschiede in der Kaliumexkretion zwischen Insulin- und Kontrolltieren lagen innerhalb der individuellen Schwankungsbreite.

5. In erheblichem Maße wurde der Eiweißstoffwechsel beeinflußt. Dies kam durch den Anstieg der Kreatinin-, die um das 3,6fache und der Harnstoffausscheidung, die um das 4fache erhöht war, zum Ausdruck.

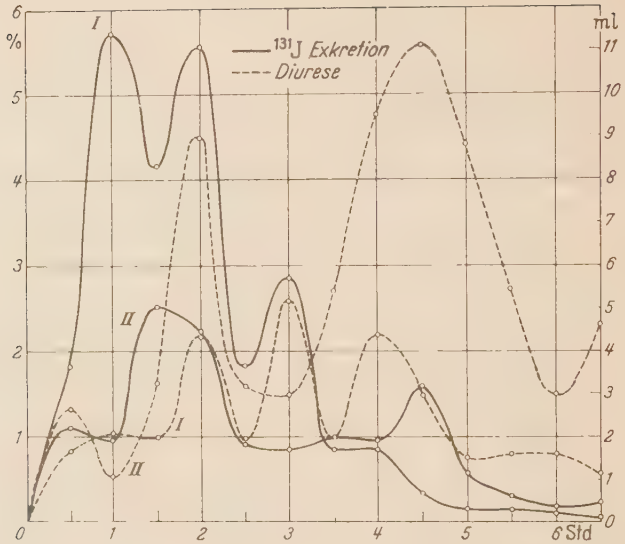


Abb. 6 Diurese und renale ^{131}J-Exkretion unter 0,3 E Insulin (Kaninchen I und II)

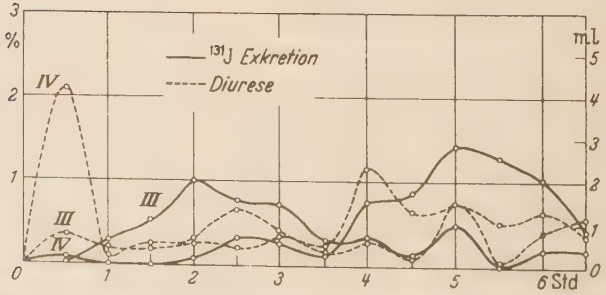


Abb. 7 Diurese und renale ^{131}J-Exkretion der Kontrolltiere (Kaninchen III und IV)

	Tier	ml Urin	mg Gesamt-phos-phat	K mval	Na mval	Ca mval	Cl mval	Mg mval	mg Krea-tinin	mg Harn-stoff
Kontrolle	1.	135	97,2	163	103	49	102	16,9	77,3	1155
	2.	15	11,9	68,4	33,0	29,4	11,9	2,36	16,8	471
	3.	14,5	0,107	88,3	6,35	22,8	9,5	1,78	9,4	223
	4.	57	2,05	207	12,3	47,5	47,0	6,9	51,0	747
	5.	60	13,7	108	37,0	16,5	48,2	6,07	53,4	616
	6.	59,1	9,22	86,2	17,0	24,0	2,6	7,45	35,2	607
0,1 E Insulin	1.	145	148,0	148,2	148,0	10,7	104,0	18,5	177,0	2570
	2.	142	84,8	145,0	106,0	34,2	112,0	18,6	155,0	3240
	3.	200	27,0	208	138,0	74,5	121,0	24,2	184,4	3880
	4.	66	14,1	64,3	35,6	6,45	46,5	7,2	88,5	1620
	5.	135	33,2	76,6	104,0	7,94	9,36	11,9	118,0	1750
	6.	178	40,7	137	131,0	13,1	11,5	17,1	146,0	2140

Tabelle 4 Renale Exkretion bei Kaninchen unter 0,1 E Altinsulin

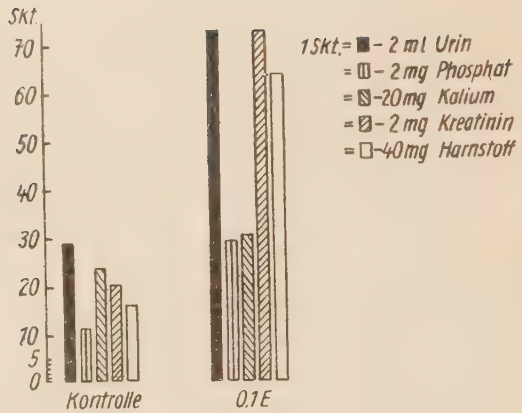


Abb.8: Mittelwerte der renalen Exkretion bei hungernden Kaninchen unter Insulin

In einem weiteren Versuch wurde an mehreren Tagen Insulin injiziert. Hierbei wurden die oben erwähnten Ergebnisse bestätigt. Das Tier wurde unter Nahrungszufuhr 9 Tage lang im Stoffwechselkäfig gehalten, wobei der erste Tag als Kontrollwert verwendet wurde. Nach der subcutanen Injektion von 0,5E Altinsulin Hoechst schied das Tier innerhalb von 2 Stunden 29% mehr Urin als am Vortag innerhalb von 24 Stunden aus. In den folgenden 22 Stunden nahm die diuretische Wirkung des Insulins ab. Die gesamte Tagesurinmenge betrug das 2,7fache des Kontrolltages. In den darauffolgenden Tagen sank die Exkretion wieder auf den Normalwert. Nach wiederholter Insulininjektion stieg die Diurese wieder in demselben Maße an, um an den Tagen ohne Insulin wieder auf den Ausgangswert abzusinken. An diesem Befund konnte die Beeinflussbarkeit der renalen Exkretion durch Insulin besonders

eindeutig gezeigt werden. Parallel zur vermehrten Harnausscheidung erfolgte die Phosphatexkretion. Innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Insulininjektion wurde die Gesamtphosphatmenge des Vortages um 11% überschritten. Insgesamt wurden in 24 Stunden 210% mehr Phosphat ausgeschieden. Derselbe Effekt konnte nach wiederholter Insulininjektion erzielt werden. Die Kaliumexkretion stieg in zwei Stunden um 135% und betrug in 24 Stunden 480% gegenüber dem Vortag. Dies traf auch für wiederholte Insulininjektionen zu. Der Kreatiningehalt stieg auf das 8,1fache, der Harnstoffwert auf das 6,6fache an.

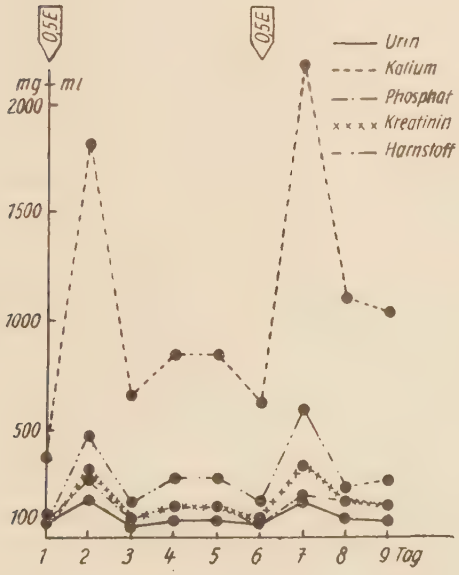


Abb.9: Renale Exkretion beim Kaninchen nach wiederholter Insulininjektion

Patient B.R.: Bei diesem Patienten wurde der 24 Stundensammelurin drei Tage als Kontrolle verwendet und an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 20E Altinsulin Hoechst subcutan injiziert. Die diuretische Wirkung kam auch bei diesem Patienten zur Geltung. Sie stieg unter mehrmaliger Insulingabe progressiv an. Dies traf noch mehr bei der Gesamtphosphatausscheidung zu. Der Zuwachs betrug an den aufeinanderfolgenden Tagen 11%, 11,7% und am dritten Tag 52%. Die Kaliumausscheidung war unter Insulin um 62% erhöht. Die Kreatinin- und Harnstoffwerte stiegen über die drei Tage progressiv an. Kreatinin wurde am ersten Tag um 49% und an den folgenden Tagen um 58% und 62% vermehrt ausgeschieden. Parallel verliefen die Harnstoffwerte, die um 63%, 78% und 87% erhöht waren.

Patient M.J.: Die Niere dieses Patienten sprach in derselben Weise wie die der Tiere auf Insulin an. Auf die Injektion von 20E Altinsulin Hoechst stieg die Exkretionsleistung an. Es erfolgte eine vermehrte Diurese gegenüber den Vortagen, die zur Kontrolle verwandt wurden. Gleichzeitig wurde am ersten Tag nach der Injektion 26% und am zweiten Tag 53% mehr Gesamtphosphat im Urin ausgeschieden. Die Kaliumexkretion erhöhte sich um 93% nach der Insulininjektion, während sie sich am zweiten Tag dem Ausgangswert näherte und nur noch um 26% höher lag. Die Kreatininwerte waren um 42% bzw. um 57% erhöht.

Patient S.O.: Zwei 24 Stundensammelurinportionen wurden als Kontrolle verwandt. Obwohl an Hand des Phenolrottestes eine starke tubuläre Schädigung der Niere festgestellt wurde, sprach die Niere auf 20E Depot-Insulin an. Durch die Verwendung von Depot-Insulin hielt die vermehrte Gesamtphosphatausscheidung über mehrere Tage an. Die Steigerung betrug über die drei folgenden Tage 182%. Gleichzeitig sank mit der erhöhten Phosphatausscheidung der Serumphosphatspiegel. Dieser war durch die hohe Dosierung des AT 10 mit dem Ca-Wert erhöht. Unter Insulingaben sank dieser in kurzer Zeit ab. Dagegen war bei diesem Patienten die Kaliumexkretion reduziert. Die Kreatininwerte stiegen im Urin nur wenig an und sanken infolge dessen im Serum nur geringfügig.

Pat:	Tag	K mval	Na mval	Ca mval	Mg mval	Cl mval	g Kreatinin	g Harnstoff	mg Gesamt P	ml Urin	spez, Gew.
B. R.	1.	382	748	41,6	73 400	745	1,06	12,3	715	1075	1010
	2.	459	718	34,2	64 800	745	1,12	13,9	890	870	1011
	3.	261	591	19,4	28 800	302	0,565	7,1	677	430	1017
	20 E 4.	582	856	29,4	62 000	721	1,37	17,9	842	1255	1017
	20 E 5.	596	640	43,1	74 500	550	1,45	19,6	890	1270	1013
	20 E 6.	605	1040	51,0	97 000	826	1,49	20,6	1160	1735	1010
M. J.	1.	111	364	30,4	25 000	294	0,338	—	148	1550	1000
	2.	103	298	44,1	40 600	310	0,392	—	113,8	1800	1001
	20 E 3.	206	368	14,1	23 700	330	0,519	—	165,0	1920	1002
	4.	135	414	31,0	26 000	136	0,575	—	200,0	2640	1000
S. O.	1.	650	1450	216	96	143	0,61	—	202	1940	1013
	2.	640	1550	251	104	161	0,898	—	204	2080	1004
	20 E 3.	425	1430	179	93	101	0,86	—	493	1540	1002
	4.	459	1680	142	82	117	0,84	—	644	1700	1008
	5.	525	1920	120	80	130	0,914	—	586	1800	1004
					Serum						
	2.	4,27 mval %	144 mval %	4,8 mval %	1,57 mval %	—	3,36 mg %	—	6,88 mg %	—	—
	5.	4,38 mval %	143 mval %	4,3 mval %	2,68 mval %	—	2,83 mg %	—	5,4 mg %	—	—

Tabelle 5 Serumwerte und Werte der renalen Exkretion bei nierenkranken Patienten

Diskussion

Aus den oben angeführten Versuchen an Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Patienten mit tubulär geschädigten Nieren geht eindeutig hervor, daß die Niere in ihrer Exkretionsleistung durch Insulin beeinflußt werden kann. Das Insulin bewirkt eine erhöhte Exkretionsmenge. Die Ergebnisse von Vogel (24) und Butturini (5) konnten nicht bestätigt werden. Während Vogel (24) die verminderte Diurese auf eine Senkung der arteriellen und venösen Durchblutung und eine hierdurch hervorgerufene verminderte Filtration zurückführte, nahm Butturini (5) eine vermehrte Wasserrückresorption an. Vogel (24) benützte für seine Durchströmungsversuche sehr hohe Dosen an Insulin (4,5-5E auf 30-40 gr. Frosch Lebendgewicht). Ausserdem legte er die Niere frei und pankreatektomierte die Tiere. Diese Methode weicht stark von den physiologischen Bedingungen ab. Butturini (5) fand bei Patienten keine Einschränkung der Durchblutung oder der Filtrationsmenge. Er wählte aber eine kurze Versuchsdauer. Aus methodischen Gründen ließen sich diese Befunde dieser Autoren nicht ohne weiteres mit den oben ausgeführten Ergebnissen vergleichen. Dagegen beobachtete Cambier (6) mit Hilfe der Kreatinin-Clearance, Spühler (20), Kleinschmidt (16), Greif (9), Robertson und Gray (19) mit Hilfe der Inulin-Clearance bei insulinbehandelten, aber noch nicht nierengeschädigten Diabetikern, eine erhöhte Filtratmenge. Da in den von uns durchgeführten Untersuchungen im Tierexperiment durch Insulin an der gesunden Niere ähnliche Effekte nachweisbar waren, darf angenommen werden, daß die vermehrte Filtration durch Insulin hervorgerufen wurde und nicht durch diabetisch bedingte Stoffwechselschwankungen verursacht wurden. Die hohe Insulinkonzentration im peripheren Kreislauf war in beiden Fällen unphysiologisch. Durch das vermehrte Tubulusepithelwachstum soll beim Diabetiker die vermehrte Filtration kompensiert werden. Wieweit die vermehrte Diurese nur auf eine Permeabilitätsänderung der Glomerulusmembran durch Insulin, oder auf eine zusätzliche Sekretion zurückzuführen ist, kann mit den gegenwärtig bekannten Methoden nicht geklärt werden.

Die von Butturini (5) beschriebene Hypophosphatämie nach Insulinapplikation konnte bestätigt werden. Es kann angenommen werden, daß dieser Effekt weitgehend auf eine vermehrte renale Phosphatexkretion zurückzuführen ist. Bei allen Tieren und Patienten wurde vermehrt Phosphat im Urin ausgeschieden. Die Menge konnte durch die Höhe der Insulindosis, sowohl durch einmalige als auch mehrmalige Insulininjektion beeinflußt werden, wobei die Phosphatausscheidung im Urin annähernd parallel zur steigenden Insulinkonzentration verlief. Auf Grund des Anstiegs der Insulinkonzentration in den Tubuluszellen (Narahara (17) kann eine vermehrte tubuläre Phosphatsekretion angenommen werden. Bei Untersuchungen mit trägerfreiem ^{32}P ergab sich eine verminderte spezifische Radioaktivität und eine verminderte Gesamtradioaktivität im Urin. Dies ist nur durch eine Aktivierung des gesamten Phosphatstoffwechsels durch Insulin erklärbar, die zum Teil auch durch die Wirkung des Radiophosphors selbst (Heilmeyer und Begemann (10) ausgelöst werden kann.

Da nach Untersuchungen von Black (1) das Kalium nur tubulär sezerniert wird, darf angenommen werden, daß die vermehrte tubuläre Kaliumsekretion durch einen direkten Angriff des Insulins an den Tubuli hervorgerufen wurde.

Derselbe Schluß kann aus der vermehrten renalen $^{131}J^-$ Exkretion unter dem Einfluß unphysiologisch hoher Dosen an Insulin gezogen werden. Die Kontrolluntersuchungen unter Glukagon zeigen, daß die erhöhte $^{131}J^-$ Exkretion durch Insulin und nicht durch eine Beimengung von Glukagon hervorgerufen wurde. Aus dem Verlauf der $^{131}J^-$ Exkretionskurve kann entnommen werden, daß nach 2 Stunden die Insulinwirkung an der Niere bezüglich der Jodidausscheidung aufgehoben war. Die Chloridausscheidung war weitgehend von der Diurese abhängig, dagegen verlief die $^{131}J^-$ Exkretion nicht parallel mit der Chloridausscheidung. Bei den Kontrolltieren entsprach die $^{131}J^-$ Exkretion annähernd den Befunden von Pahaut (18) und Bricker (3). Durch Insulin wurde die $^{131}J^-$ Speicherung in der Thyreoidea, sowie die Jodthyroninsekretion praktisch nicht beeinflußt.

Die Erhöhung der Kreatinin- und Harnstoffwerte weisen auf die Aktivierung des Leberstoffwechsels hin.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Bei Stoffwechseluntersuchungen an Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und nierenkranken Patienten wurde nach Insulinapplikation regelmäßig eine erhöhte renale Exkretion von Kreatinin, Harnstoff, sowie von Phosphat- und Kaliumionen gefunden. Mit der $^{131}J^-$ Technik wurde bei Kaninchen und Ratten in den ersten Stunden eine vermehrte $^{131}J^-$ Exkretion nachgewiesen, die unabhängig von der Diurese und Chloridausscheidung war. Ein Einfluß von Insulin auf den Jodstoffwechsel in der Thyreoidea konnte nicht nachgewiesen werden. Die Frage eines direkten Angriffs von Insulin auf die renale Exkretion wurde diskutiert.

L i t e r a t u r

1. Black, Davies, Emery, Wade Clin.Sci. 15, 277 (1956)
2. J.H.Bland Störungen d.Wasser- und Elektrolythaushaltes S.460 Thieme Verlag Stuttgart (1959)
3. Bricker N.S. und Ch. J.Illad jr. J.clin.Invest. 34, 1057 (1955)
4. Buschmann, Fritze, Marsch Deutsch. Med.Wochenschr.30, 1284 (1958)
5. U.Butturini, V.Vonomini Helv.Med.Acta 5,617 (1958)
6. P.Cambier Ann.Med. 35,273 (1934)
7. A.Goth, L.Lengyel, G.Savely Diabetes Mellitus III S.194 Thieme Verlag Stuttgart 1959
8. E.Grafe, J.Kühnau Handb. d. Inn.Med.VII/2 S.289 Springer Verl. 1955
9. St.Greif, E.Cordes, E.Moro Wien. klin.Wschr.64, 175 (1952)
10. L.Heilmeyer, H.Begemann Handb.d.Inn.Med.II S.469 Springer Verl. 1951
11. L.v.Holt, J.Nolte, C.v.Holt Endecrinologie 37, 36 (1959)
12. E.P.Joslin, J.L.Wilson Brit.Med.J.1950/II 1293
13. Keiderling W. und d.Emrich Dtsch.med.Wschr. 85, 747 (1960)
14. King Biochem. J. 26, 292 (1943)
15. P.Kimmelstiel, K.F.Wellmann Med.Welt Jahrgang 1960, 1
16. A.Kleinschmidt Verh.dtsch.Ges.inn.Med.57,216 (1951)
17. H.T.Narahara, N.B.Everett, B.S.Simmons, R.H.Williams Am.J.Physiol. 192 (1958) 2, 227
18. Pahaut J., J.Covaerts und P.Bonhomme Nature (London) 172, 545 (1953)
19. J.A. Robertson, C.H.Gray Lancet 1953/II 12
20. O.Spühler Zur Physio-Pathol.d.Niere (Bern 1946)
21. G.Stalder, R.Schmid, M.v.Wolff Dtsch.Med.Wschr.85, 346 (1960)
22. Tong W.J.L.Chaikoff J.biol.Chem. 232, 939 (1958)
23. Vogel G. Naun. Schmiedebergs Arch. 206,647 (1949)
24. G.Vogel Pflügers Arch. 269,341 (1959)
25. H.Weil-Malherbe und Green Biochem.J.49,286 (1952)

B. Untersuchung der renalen Phosphatexkretion beim Menschen mit trägerfreiem ^{32}P

Zur Ergänzung der oben angeführten Untersuchungen und zur weiteren Klärung des Mechanismus der renalen Phosphatexkretion, wurde bei einem Patienten, dem aus therapeutischen Erwägungen trägerfreies ^{32}P injiziert wurde, die ^{32}P Exkretion untersucht.

Die meisten Untersuchungen über die renale Phosphatausscheidung sind als Clearanceversuche angestellt worden und basieren auf der Annahme, daß das im Plasma zirkulierende anorganische Phosphat filtrierbar ist. Es ist seit langem bekannt, daß im Urin höhere Phosphatkonzentrationen vorliegen als im Serum. Nach Walker und Hudson (14) steigt die Konzentration vom Glomerulus distalwärts progressiv an. In der Literatur ist häufig die Frage diskutiert worden, ob die erhöhte Phosphatkonzentration im Urin lediglich durch eine vermehrte Wasserrückresorption bedingt wird, oder ob auch eine Phosphatsekretion in der Niere stattfindet. Zur Klärung des Mechanismus der renalen Phosphatexkretion sind von mehreren Autoren Untersuchungen mit Radiophosphor durchgeführt worden.

Govaerts (7) fand bei Hunden im Urin eine Erhöhung der spezifischen Radioaktivität gegenüber dem Plasma nach einer Phosphatinfusion mit ^{32}P. Friedlander und Wilde (4), Handler und Cohn (8), Ström (13) und Schmid (12) bestätigten diese Ergebnisse. Covaerts (7) führte den Unterschied in der spezifischen Radioaktivität auf einen Ca-Phosphatkomplex im Plasma zurück, der nur einen langsamen Phosphataustausch zulassen und im Glomerulus nicht filtrierbar sein soll. Dagegen ergaben Untersuchungen desselben Autors mit ^{45}Ca dieselbe spezifische Radioaktivität im Plasma und im Urin, im Gegensatz zu jenen mit ^{32}P. Handler und Cohn (8) führten den Unterschied in der spezifischen Radioaktivität auf einen Totraum (lag) der Niere zurück. Sie bezeichneten hiermit die Zeitdifferenz zwischen der Filtration und dem Auftritt des Urins in der Blase. An nicht anästhesierten Tieren stellte Henry (10) fest, daß der Totraum vernachlässigt werden kann und führte die großen Totraumzeiten (lag time) auf die Wahl der Versuchsbedingungen (Anästhesie, freigelegte Ureteren)

zurück. Auf Grund von Untersuchungen zur Prüfung der verzögerten Urinausscheidung bei Patienten kam Östling (II) zu der Annahme, daß die Differenz nicht durch den Totraum hervorgerufen wird, sondern durch eine unterschiedliche Ausscheidung von infundiertem (exogenem) und nicht infundiertem (endogenem) Phosphat. Nur bei einer Patientin mit doppelseitiger Nierentuberkulose war die spezifische Radioaktivität im Plasma höher als im Urin. Die bisher zitierten Untersuchungen gingen von der Annahme aus, daß das anorganische Phosphat filtrierbar ist und tubulär rückresorbiert wird. Dagegen hat Fischer (3) bei einem Patienten mit Thrombose der Venae renales eine tubuläre Sekretion von anorganischem Phosphat angegeben. Die bisher angeführten Untersuchungen haben keine eindeutige Klärung der Frage gebracht, ob und inwieweit anorganisches Phosphat sezerniert wird. Als Beitrag zu dieser Fragestellung wurden die nachfolgenden Untersuchungen bei einem Patienten mit Polyglobulie, der therapeutische Dosen an Radiophosphor erhalten hatte, mit modernen chromatographischen Verfahren angestellt.

M e t h o d i k

Patient N.L. 55 J. wurde wegen Polyglobulie mit Rechtsinsuffizienz mit 7 mC ^{32}P, in 10 ml 0,9%iger NaCl aufgenommen, intravenös behandelt. Vor Versuchsbeginn wurde mit einem Mercier Urethrakatheter, der über die ganze Versuchsdauer liegen blieb, die Harnblase entleert. Die Injektion wurde in die linke Vena cubitalis gemacht, während zur Blutentnahme die rechte Vena cubitalis punktiert wurde. Die Versuchsdauer ging über 4 Stunden. In dieser Zeit wurde 3 mal Blut entnommen, sofort zentrifugiert, das Serum abpipettiert und mit Trichloressigsäure 1:1 enteiweißt. Der Trichloressigsäureextrakt wurde chromatographiert und zur Phosphatbestimmung verwandt. Während derselben Zeit wurde in 7 Portionen über den Katheter Urin abgelassen, und dieser direkt zur Phosphatbestimmung und zur Chromatographie verwandt.

Die Phosphatbestimmung wurde nach Weil-Malherbe und Green (15) gemacht, wobei die Extinktion auf P bezogen wurde. Die-

se Methode ist für Mikromessungen besonders geeignet, da durch sie ausschließlich das anorganische Phosphat erfaßt wird.

Die spezifische Radioaktivität pro γP ergibt sich in einfacher Weise durch Division der im Butanolextrakt gemessenen Radioaktivität durch die Phosphatmenge in γ(Imp/γP). Zur Chromatographie wurde ein Gemisch von 40 ml n-Butanol, 20 ml n-Propanol, 25 ml Aceton, 25 ml 80%ige Ameisensäure, 15 ml 30%ige Trichloressigsäure (Gerlach 5) verwandt, sowie mit Titriplex bei pH 8,5 vorbehandeltes Papier (Schleicher und Schüll Nr.2316).

Die Chromatogramme wurden folgendermaßen angefärbt: A.Molybdänreagenz:2% (g/v) Na-Molybdat und 0,8% (v/v) konz. HCl in Methanol wird langsam mit Äther bis zur leichten Trübung versetzt und durch die kleinste Menge Methanol eben wieder geklärt.

B.Reduktionsreagenz: 0,1g Benzidinhydrochlorid in 10%iger Essigsäure mit gleichen Volumteilen gesättigter Na-acetatlösung versetzt. Kurzes Eintauchen in A. trocknen, dann zur zur Reduktion kurz in B. eintauchen (Bozkourt Wahler 2).

Die Radioaktivitätsmessung im Serum und Urin erfolgte mit dem FH49 der Firma Frieske & Höpfner und einem Geiger-Müller Flüssigkeitshalogenzählrohr. Die Radiochromatogramme wurden mit dem Radiochromatograph der Firma Frieseke & Höpfner ausgezählt.

Versuchsergebnisse

5 Minuten nach der Injektion wurde das erste mal Blut entnommen. Es darf angenommen werden, daß in dieser Zeit eine gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität eingetreten ist. Sie war wesentlich kleiner, als wenn sie sich nur im Blut und extrazellulären Raum verteilt hätte. In dieser kurzen Zeit muß Phosphat bereits zellulär umgesetzt worden sein. Die Gesamtaktivität sinkt sehr rasch von einem Maximum nach 5 Min. auf 4,52% nach 240 Min. ab, während die spezifische

Radioaktivität in derselben Zeit auf 4,42% des Wertes nach 5 Min. abfällt. Ebenfalls sinken die Serumphosphatwerte bis auf 42,5% gegenüber dem Ausgangswert. Das Absinken des Serumphosphatwertes ist häufig beobachtet worden (Heilmeyer und Begemann 9) und auf eine Aktivierung des Phosphatstoffwechsels durch Radiophosphor zurückgeführt worden.

Im Urin steigt die Gesamtaktivität von der Entnahme nach 10 Min. auf ein Maximum nach 30 Min. an, um von hier aus kontinuierlich bis fast auf den Ausgangswert abzusinken. Einen ähnlichen Verlauf weist die Kurve der spezifischen Radioaktovität auf. Die Phosphatwerte im Urin steigen nach 130 Min. um 17% an, und nähern sich nach 240 Min. wieder dem Ausganswert.

	Urin			Serum		
Zeit (min)	γ P	Spezifische Aktivität	Gesamtaktivität	γ P	Spezifische Aktivität	Gesamtaktivität
5	—	—	—	2,72	1425	4840
10	19,3	106	2481	—	—	—
30	18,25	1000	18019	—	—	—
60	19,65	670	13620	—	—	—
100	21,2	490	10880	—	—	—
130	22,6	520	12064	2,18	394	1000
200	21,6	290	6920	—	—	—
240	19,5	110	2800	1,16	63	219

Tabelle 1: Gesamtaktivität und spezifische Radioaktivität 0,1 ml Serum und 0,1 ml Urin

Während die Gesamtaktivität im Blut zu Beginn der Messung wesentlich höher lag, als in der aliquoten Menge Urin, übertrifft die Gesamtaktivität im Urin nach 130 Min., die des Blutes um das 12fache. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Radioaktivität wird in der nachstehend angegebenen Kurve wiedergegeben.

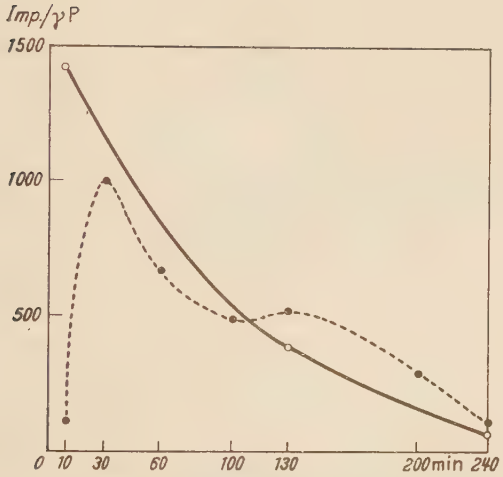
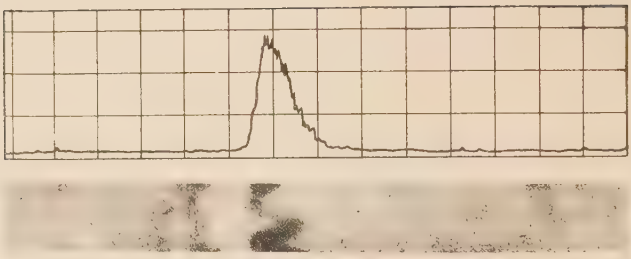


Abb. 1. Spezifische Radioaktivität im Serum und Urin

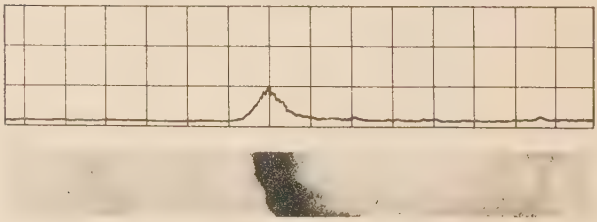
Die in den folgenden Abbildungen wiedergegebene Radiochromatogramme zeigen, daß die gesamte Radioaktivität ausschließlich in der Orthophosphatbande liegt. Für die Anfertigung der Papierchromatogramme wurden die Trichloressigsäureextrakte von 0,5 ml Serum aufgetragen, beim 5 Min.-Wert entspricht er nur 0,25 ml Serum. Zur Chromatographie des Urins wurden 0,1 ml Urin aufgetragen.

Die folgenden Abbildungen zeigen Radiochromatogramme von Serum (a-e) und Urin (d-j). Zur Ergänzung wurden K,Na,Ca, Mg,Cl, Kreatinin und Harnstoff bestimmt. Bei diesen Untersuchungen ergeben sich große Schwankungen.

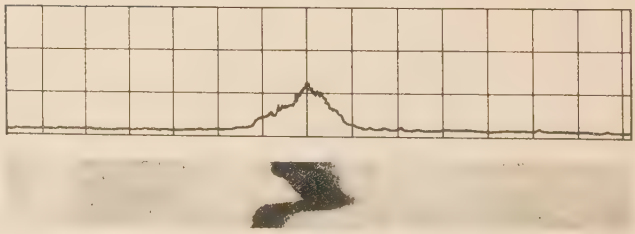


a Serum nach 5 min

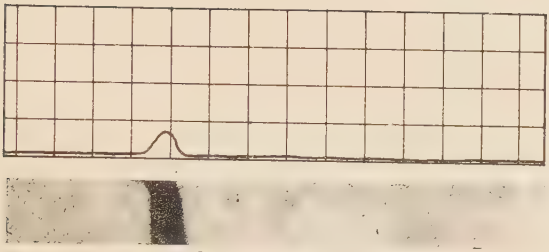
Abb. 2. Radiochromatogramme von Serum (a—c) und Urin (d—j).



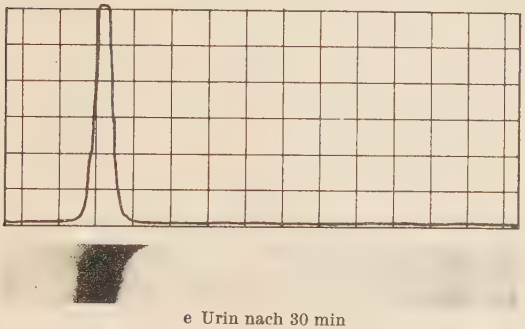
b Serum nach 130 min



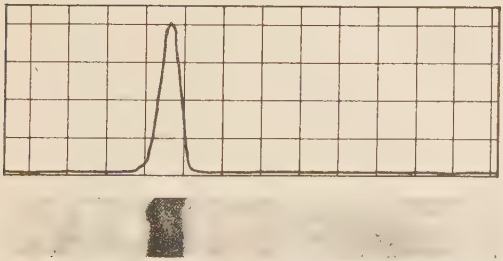
c Serum nach 240 min



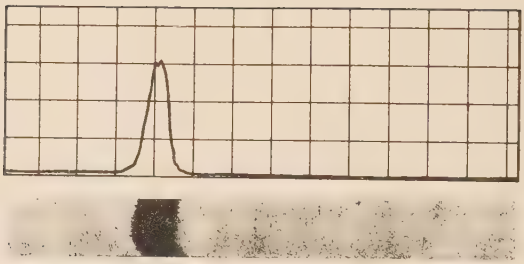
d Urin nach 10 min



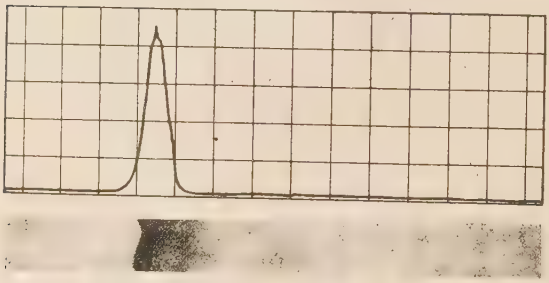
e Urin nach 30 min



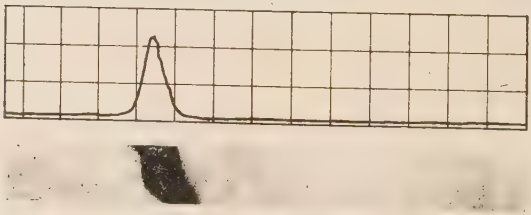
f Urin nach 60 min



g Urin nach 100 min



h Urin nach 130 min



Urin nach 200 min

Urin nach 240 min

Zeit (min)	K mval	Na mval
5	7,17	172
130	6,15	146
240	5,64	157

Tabelle 2: Untersuchungen im Serum

Zeit (min)	K mval	Na mval	Ca mval	Mg mval	Cl mval	mg-% Kreatinin	mg-% Harnstoff
10	39,7	178	6,47	7,45	112,8	82,7	1026
30	53,8	193	5,48	4,3	82,6	99,6	1026
60	53,3	214	5,28	4,14	79,0	99,5	1026
100	52,2	214	6,22	5,94	80,6	117,0	1197
130	39,4	170	10,45	6,37	80,6	134,0	1482
200	27,2	180	6,57	6,16	80,6	98,5	1368
240	26,1	226	8,06	6,9	79,0	79,0	1368

Tabelle 3: Untersuchungen im Urin

D i s k u s s i o n

Aus den angegebenen Versuchen ergibt sich, daß die gesamte Radioaktivität in der Orthophosphatbande wiedergefunden wird. Die Unterschiede zwischen Urinphosphat und Serumphosphat, die im Prinzip den Befunden von Govaerts (7) entsprechen, sind von den meisten Autoren mit der Annahme eines Ca-Phosphatkomplexes im Serum erklärt worden, der nur einen begrenzten Phosphataustausch zulassen soll. Ein derartiger Ca-Phosphatkomplex ist jedoch in vivo niemals nachgewiesen worden. Die Annahme eines verzögerten Phosphataustausches steht ferner im Widerspruch mit ^{45}Ca-Untersuchungen, bei denen eine gleiche spezifische Radioaktivität von Plasma Ca^{++} und Urin Ca^{++} gefunden wurde. Alle Autoren, die sich mit der Phosphatexkretion der Niere beschäftigt haben, gehen von der Annahme aus, daß anorganisches Phosphat im Glomerulus filtriert und anschließend tubulär rückresorbiert wird. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß hierfür kein experimenteller Beweis geliefert worden ist. Alle Untersuchungen an der Niere mit Phosphat sind als Phosphatclearanceversuche angestellt worden. Es wurde hierbei die bekannte Tatsache nicht berücksichtigt, daß anorganisches Phosphat sehr rasch von allen Zellen unter Einbau in energiereiche Phosphatbindungen und Phosphorsäureestern aufgenommen wird. Der einzig sichere experimentelle Befund besteht in der Messung der spezifischen Radioaktivität. Da mit Sicherheit angenommen werden darf, daß das ^{32}P gleiche physikalische Eigenschaften aufweist wie das normale anorganische P^{31} und ferner sicher angenommen werden kann, daß nach etwa 5 Min. eine vollständige Durchmischung im Kreislauf vorliegt, kann aus der Zeitkurve der spezifischen Radioaktivität im Serum und Urin nur geschlossen werden, daß die verminderte spezifische Radioaktivität im Urin nach 60 Min. gegenüber dem Serum, und die vermehrte spezifische Radioaktivität im Urin nach 130 Min. gegenüber dem Serum durch eine tubuläre Sekretion zustandekommt. Bezüglich des Mechanismus der tubulären Phosphatsekretion darf angenommen werden, daß diese durch Spaltung von Phosphatestern oder energiereichen Phosphaten durch Phosphatasen

im Tubulusepithel erfolgt. Hierfür würde auch der Reichtum an Phosphatasen im Tubulusepithel der Niere sprechen (Gössner 6).

Auf Grund der vorgelegten Untersuchungen darf angenommen werden, daß ein wesentlicher Teil des ausgeschiedenen anorganischen Phosphats tubulär sezerniert wird. Eine quantitative Differenzierung zwischen glomerulär filtriertem und tubulär sezerniertem anorganischem Phosphat ist aus methodischen Gründen zur Zeit nicht möglich. Für die Filtration im Glomerulus liegt bisher kein exakter Beweis vor. Aus diesem Grund eignet sich anorganisches Phosphat nicht zu Clearanceversuchen. Der Austausch von ^{32}P durch die Blasenwand erfolgt sehr rasch, spielt jedoch für die Messung im Urin quantitativ keine Rolle, da sich nach kurzer Zeit ein Gleichgewicht einstellt. (Adunts und Oganesyan 1).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Durch Radiochromatographie wurde nachgewiesen, daß intravenös verabreichtes trägerfreies ^{32}P sowohl im Serum, als auch im Urin während der ersten 4 Stunden in der Orthophosphatbande auftritt. Während die Radioaktivität im Serum kontinuierlich abnimmt, ist die spezifische Radioaktivität nach 130 Min. im Urin um 32% höher als im Serum. Als wahrscheinlichste Erklärung muß eine tubuläre Phosphatsekretion angenommen werden.

L i t e r a t u r

1. Q.T. Adunts and A.S.Oganesyan S.S.R.22, 157 (1956)
2. E.Bozkuort Wahler Naturwissenschaften 46, 16 (1959)
3. A.Fischer, C.Sellei und R.Weiss Acta med.Scan.133, 394 (1949)
4. H.D.Friedlander and W.S.Wilde Amer.J.Physiol.164,159 (1951)
5. E.Gerlach, E.Weber und H.J.Döring Arch.exp.Path. und Pharm. 226,9
6. W.Gössner Deutsch.med.Wochenschr. 83, 1754 (1958)
7. J.Govaerts Arch.intern.de Pharmacodyn.75,261 (1948)
8. P.Handler and D.V.Cohn Amer.J.Physiol.164,646 (1951)
9. L.Heilmeyer und H.Begemann Handb.d.Inneren Med.II 469 Springer (1951)
10. J.A.Henry, E.Jakobs and M.Verbanck Arch.Intren.de Parm.94, 235 (1953)
11. G.Östling and G.Töttermann Arch.intern.de Pharm,92,362 (1952)
12. E.Schmid, H.Ganz, W.Braun und R.Taugner Arch.exp.Phat. und Pharm. 224,453 (1955)
13. L.Ström Acta Paediat.40,Suppl.82 (1951)
14. Walker und Hudson Amer.J.Physiol. 118,153 (1937)
15. H.Weil-Malherbe und R.H.Green Biochem.J 49,286 (1952)

L e b e n s l a u f

Am 6.Februar 1937 wurde ich als 2.Kind des Mittelschulrektors Max Heller und seiner Ehefrau Marianne geb.Mangold in Stuttgart geboren. Meine Jugendzeit verbrachte ich in Nürtingen am Neckar. Im Jahre 1943 trat ich in die dortige Grundschule ein. Von meinem 10.Lebensjahr an besuchte ich, nachdem ich die Aufnahmeprüfung in das Nürtinger Gymnasium bestanden hatte, 9 Jahre diese Schule. Im Jahre 1956 schloß ich mit der Reifeprüfung meine Schulausbildung ab.

Im Sommersemester 1956 begann ich an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen mit dem Studium der Medizin. Nach 5 vorklinischen Semestern legte ich die ärztliche Vorprüfung im Sommersemester 1958 in Tübingen ab. Die anschließenden klinischen Semester studierte ich ebenfalls an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Nach dem Sommersemester 1961 schließe ich mein Studium mit dem Staatsexamen ab.

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen